SBT RESOLVER™

Instrucciones de Uso

PCR la Amplificación y Secuenciación de HLA Loci Clase I y II

Versión No: 15.0
Fecha de emisión: Agosto 2015

IVD

Conexio Genomics Pty Ltd
2/49 Buckingham Dr
Wangara 6065
Western Australia
Australia

EC REP

Qarad bvba
Cipalstraat 3
B-2440 Geel
Bélgica

Índice

Principio **3**

Uso previsto **3**

Composición del kit **4**

Condiciones de almacenaje **8**

Materiales, Reactivos y Equipos No Suministrados **8**

Condiciones de la muestra **9**

Advertencias y precauciones de seguridad **10**

Símbolos **10**

Procedimiento **11**

1. PCR 11
2. Electroforesis con gel de agarosa 12
3. Purificación del producto PCR 12
4. Reacción de secuenciación 13
5. Purificación de los productos de la reacción de secuenciación 15
6. Desnaturalización & electroforesis de productos de la reacción de secuenciación 15
7. Edición y análisis de los electroferogramas 16

Características del desempeño **17**

Exactitud 17
Límite de detección 18
Especificidad 18

Limitaciones y advertencias **19**

Licencia **19**

Referencias bibliográficas **19**

Resolución de problemas **20**

Productos relacionados **23**

Principio

El procedimiento de tipificación de HLA basado en secuenciación (SBT) descrito aquí, fue desarrollado originalmente por D. Sayer en 2001[1] y evolucionó a un ensayo de un solo tubo en 2004[2]. El procedimiento comprende una amplificación inicial de la secuencia diana seguida de un tratamiento enzimático para eliminar los cebadores no incorporados y dNTP. Luego se utiliza el amplicón como plantilla para secuenciación fluorescente automatizada directa, con cebadores de ADN de secuenciación específicos y la química de secuenciación Big Dye® Terminador disponible en Applied Biosystems™ de Life Technologies™. Los productos de extensión se purifican de acuerdo con el método de precipitación con etanol y se desnaturalizan con Hi-Di™ formamida disponible en Applied Biosystems™ en Life Technologies™, antes de la separación y detección en un secuenciador de fluorescencia automático para ADN. Se recomienda que los datos resultantes sean analizados con el software de análisis de secuencias Assign™ SBT de Conexio Genomics Pty Ltd[3-5].

Uso previsto

Los kits Conexio Genomics' SBT Resolver™ HLA SBT se utilizan para la tipificación de genes HLA Clase I (HLA-A, -B, y -C) y Clase II (HLA-DRB1, -DQB1 y -DPB1) en un laboratorio de ADN genómico. Cada kit contiene reactivos que facilitan la amplificación por PCR y la secuenciación de ADN de un gen dado. Los datos resultantes de la secuenciación se interpreta utilizando el software Conexio Genomics' Assign™ SBT. Debe hacerse notar que estos kits SBT no son utilizados para diagnosticar enfermedades.

Composición del kit

Kit	Nº de Catálogo	Σ	Contenido† PRE-PCR (Nº de viales)		Contenido POST-PCR (Nº de viales)		
Clase I							
HLA-A	XH-PD1.1-2(20)	20 pruebas	DNA POL- HLA-A	1 x 25µL	AEX1F	AEX1R	1 x 44µL c/u
			HLA-A MIX	1 x 352µL	AEX2F	AEX2R	
					AEX3F	AEX3R	
					AEX4F	AEX4R	
	XH-PD1.1-2(50)	50 pruebas	DNA POL- HLA-A	1 x 60µL	AEX1F	AEX1R	1 x 110µL c/u
			HLA-A MIX	1 x 880µL	AEX2F	AEX2R	
					AEX3F	AEX3R	
					AEX4F	AEX4R	
HLA-B	BS-PD2.1-2(20)	20 pruebas	DNA POL- HLA-B	1 x 25µL	BEX1F	BEX2F	1 x 44µL c/u
			HLA-B MIX	1 x 352µL	BEX2R	BEX3F	
					BEX3R	BEX4F	
					BEX4R		
	BS-PD2.1-2(50)	50 pruebas	DNA POL- HLA-B	1 x 60µL	BEX1F	BEX2F	1 x 110µL c/u
			HLA-B MIX	1 x 880µL	BEX2R	BEX3F	
					BEX3R	BEX4F	
					BEX4R		

Kit	Nº de Catálogo	Σ	Contenido† PRE-PCR (Nº de viales)		Contenido POST-PCR (Nº de viales)		
HLA-C	HH-PD 3.2-2(20)	20 pruebas	DNA POL- HLA-C HLA-C MIX	1 x 25µL 1 x 352µL	CEX1F CEX2F CEX3F CEX4F CEX5F CEX6F CEX7F	CEX1R CEX2R CEX3R CEX4R CEX5R CEX6R	1 x 44µL c/u
	HH-PD 3.2-2(50)	50 pruebas	DNA POL-HLA-C HLA-C MIX	1 x 60µL 1 x 880µL	CEX1F CEX2F CEX3F CEX4F CEX5F CEX6F CEX7F	CEX1R CEX2R CEX3R CEX4R CEX5R CEX6R	1 x 110µL c/u
Clase II							
HLA-DRB1	HH-PD5.2-5(20)	20 pruebas	DNA POL- DRB1 HLA-DRB1 MIX	1 x 10µL 1 x 370µL	DRB1EX2F DRB1EX3R-2	DRB1EX2R-2 RB-TG344-R	1 x 44µL c/u

Kit	Nº de Catálogo	Σ	Contenido† PRE-PCR (Nº de viales)		Contenido POST-PCR (Nº de viales)	
	HH-PD5.2-5(50)	50 pruebas	DNA POL- DRB1 HLA-DRB1 MIX	1 x 20µL 1 x 920µL	DRB1EX2F, DRB1EX2R-2 DRB1EX3R-2, RB-TG344-R	1 x 110µL c/u
	LG-PD5.2-7(20)	20 pruebas	DNA POL – DRB1 HLA-DRB1 MIX	1 x 10µL 1 x 370µL	DRB1EX2F, DRB1EX2R-2 DRB1EX3F-7, DRB1EX3R-7 RB-TG344-R	1 x 44µL c/u
	LG-PD5.2-7(50)	50 pruebas	DNA POL – DRB1 HLA-DRB1 MIX	1 x 20µL 1 x 920µL	DRB1EX2F, DRB1EX2R-2 DRB1EX3F-7, DRB1EX3R-7 RB-TG344-R	1 x 110µL c/u
HLA-DQB1	PQ-PD6.2-2(20)	20 pruebas	DNA POL- DQB1 HLA-DQB1 MIX	1 x 10µL 1 x 370µL	DQB1EX2F, DQB1EX2R DQB1EX3F, DQB1EX3R	1 x 44µL c/u
	PQ-PD6.2-2(50)	50 pruebas	DNA POL- DQB1 HLA-DQB1 MIX	1 x 20µL 1 x 920µL	DQB1EX2F, DQB1EX2R DQB1EX3F, DQB1EX3R	1 x 110µL c/u
	AN-PD6.2-3 (20)	20 pruebas	DNA POL- DQB1 HLA-DQB1 MIX	1 x 10µL 1 x 370µL	DQB1EX2F, DQB1EX2R-3 DQB1EX3F, DQB1EX3R	1 x 44µL c/u
	AN-PD6.2-3 (50)	50 pruebas	DNA POL- DQB1 HLA-DQB1 MIX	1 x 20µL 1 x 920µL	DQB1EX2F, DQB1EX2R-3 DQB1EX3F, DQB1EX3R	1 x 110µL c/u

Kit	Nº de Catálogo	Σ	Contenido† PRE-PCR (Nº de viales)		Contenido POST-PCR (Nº de viales)	
HLA-DPB1	HH-PD10.1(20)	20 pruebas	DNA POL – DPB1 HLA-DPB1 MIX	1 x 10µL 1 x 370µL	DPB1EX2F DPB1EX2R	1 x 44µL c/u
	HH-PD10.1(50)	50 pruebas	DNA POL – DPB1 HLA-DPB1 MIX	1 x 20µL 1 x 920µL	DPB1EX2F DPB1EX2R	1 x 110µL c/u
	KD-PD10.2-1(20)	20 pruebas	DNA POL – DPB1 HLA-DPB1 MIX	1 x 10µL 1 x 370µL	DPB1EX1F DPB1EX1R DPB1EX2F DPB1EX2R DPB1EX3F DPB1EX3R DPB1EX4F DPB1EX4R DPB1EX5F DPB1EX5R PB-AG341-R	1 x 44µL c/u
	KD-PD10.2-1(50)	50 pruebas	DNA POL – DPB1 HLA-DPB1 MIX	1 x 20µL 1 x 920µL	DPB1EX1F DPB1EX1R DPB1EX2F DPB1EX2R DPB1EX3F DPB1EX3R DPB1EX4F DPB1EX4R DPB1EX5F DPB1EX5R PB-AG341-R	1 x 110µL c/u

†El kit PRE-PCR contiene un vial con una mezcla PCR locus específica (p. ej. **HLA-A MIX**) que consiste en un tampón PCR, dNTP, $MgCl_2$, y cebadores PCR locus específico, junto con un vial único de ADN polimerasa (p. ej. **DNA POL- HLA-A**).

El kit POST-PCR contiene cebadores para secuenciación (p. ej. **AEX1F**).

Condiciones de almacenaje

Las cajas PRE- y POST-PCR se pueden separar y conservarse en congeladores designados PRE- y POST-PCR. Cuando se almacenan a -20°C (rango de temperatura de -15°C a -25°C es aceptable), los componentes del kit se pueden utilizar hasta la fecha de caducidad indicada en los envases externos del kit y pueden tolerar hasta 25 ciclos de congelamiento y descongelamiento.

Pruebas aceleradas de estabilidad para los kits de HLA-A, -B, -C, –DRB1, -DQB1 y –DPB1 indicaron una vida útil de dos años y medio desde la fecha de fabricación al ser almacenados a -20°C. Mientras se están llevando a cabo pruebas confirmatorias en tiempo real, se recomienda insistentemente NO utilizar estos kits más allá de su fecha de caducidad.

Para mantener el desempeño óptimo del kit, se deben sacar los componentes del kit del almacenaje a -20°C y se deben descongelar rápidamente a temperatura ambiente antes de utilizarlos. Los componentes del kit con la excepción de la polimerasa se deben agitar suavemente en un vortex para asegurar que los componentes de cada tubo se mezclen adecuadamente después de descongelar. Después de usarlo, el kit/los componentes deben devolverse inmediatamente al almacenaje a -20°C.

Materiales, Reactivos y Equipos No Suministrados

PCR

1. Agua estéril
2. Pipetas electrónicas o mecánicas y puntas resistentes al aerosol
3. Termociclador con cubierta térmica
   Estos kits han sido validados usando los siguientes termocicladores:

   MJ Investigación PTC 225 Motor ADN DYAD™, Applied Biosystems™ de Life Technologies™ Veriti™ Thermal cycler, Gene Amp® PCR Sistema 9700, y Eppendorf Mastercycler® Pro.

   El uso de otros termocicladores con estos kits requiere validación por el usuario
4. Tubos de 0,2mL de paredes delgadas para reacción termocíclica (tiras de 8 pocillos o microplacas con 96 pocillos).
   Use los recomendados para su termociclador.
5. Tubos de 1,5mL estériles
6. Área de trabajo estéril como una cámara de seguridad biológica.
7. Centrífuga de mesa con adaptadores para contenedores y una capacidad de alcanzar 2500 x g
8. Agitador Vortex

Electroforesis en gel de agarosa

9. Aparato de electroforesis con gel de agarosa
10. Gel TBE con 1% de agarosa (grado de biología molecular) con 0,1µg/mL de bromuro de etidio.
11. Tampón para cargar
12. Marcador para PCR adecuado para cubrir el rango de 300 – 1300 bp
13. Transiluminador luz UV

Purificación del producto de la PCR

14. ExoSAP (USB® ExoSAP-IT® (Cat Nº 78200 para 100 reacciones) o Illustra™ ExoProStar™ Cat No US77702 para 100 reacciones)

15. 2mM $MgCl_2$ (Disponible para comprar en Conexio Genomics, código del producto MgCl2-1,0(50) o MgCl2-1,0(3000))

16. Agitador

    La utilización de técnicas alternativas de purificación PCR requiere de validación por el usuario antes de su uso.

Reacción de secuenciación

17. V3.1 o v1.1 de BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems™ by Life Technologies™.

18. Tampón de reacción de secuenciación x5 (Conexio Genomics, código del producto BUF-2.0(400) o SEQ BUF-2.0(5000)) o BigDye® Terminator v3.1 o v1.1 Tampón de secuenciación x5, Applied Biosystems™ de Life Technologies™.

Purificación de los productos de secuenciación

19. 125mM EDTA, pH8,0 (Disponible para comprar en Conexio Genomics, código del producto EDTA-3.0(200) o EDTA-3.0(5000)).

20. Etanol absoluto y 80%. Cada procedimiento requiere etanol 80% recién preparado que consiste en etanol absoluto y agua estéril. NO UTILICE ETANOL DESNATURALIZADO, (también conocido como alcohol de quemar en algunos países).

    La utilización de técnicas alternativas de purificación de secuenciación requiere de validación por el usuario antes de su uso.

Desnaturalización y electroforesis de los productos de la reacción de secuenciación

21. Hi-Di™ Formamida, Applied Biosystems™ by Life Technologies™, código del producto 4311320

22. Secuenciador automático de ADN y accesorios (p. ej. Applied Biosystems™ by Life Technologies™ ABI Prism® 3730), incluyendo colección de datos y software.

    Estos kits han sido probados y validados en los secuenciadores capilares y el software de Applied Biosystems™ by Life Technologies™ 3100, 3730 and 3730xl.

    La utilización de otras técnicas de desnaturalización y plataformas de secuenciación requiere de validación por el usuario antes de su uso.

23. Software para análisis de secuenciación de HLA (p. ej. Assign™ SBT, versión 3.6+ o posterior Conexio Genomics Pty Ltd).

Condiciones de la muestra

1. Agua estéril grado cultivo celular (negativo/ sin plantilla control)

2. ADN genómico humano de alto peso molecular (concentración entre 20-100ng/µL en tampón Tris/EDTA y $DO_{260/280}$> 1,8) extraído de muestra de sangre total anti coagulada con ACD o EDTA. NO use muestras de sangre total con heparina.

Advertencias y precauciones de seguridad

- Este kit debe ser usado por personal de laboratorio entrenado y autorizado.
- Todas las muestras, equipos y reactivos deben manipularse de acuerdo con la buena práctica de laboratorio. Especialmente todas las muestras de pacientes deben considerarse como potencialmente infecciosas. Recomendamos insistentemente el uso de guantes y batas de laboratorio. Manipule y deseche todas las muestras de acuerdo con las directrices locales y nacionales.
- NO hay sustancias peligrosas en ninguno de los componentes del kit.
- NO use los reactivos más allá de la fecha de caducidad.
- NO se recomienda el uso de componentes de kits de distintos lotes. Esto puede afectar el desempeño del ensayo.
- El uso de reactivos no incluidos en este kit o en la lista de "Materiales, reactivos y equipos no suministrados" (p. ej. *Taq* ADN polimerasas alternativas) NO se recomienda. Esto puede afectar el desempeño del ensayo.
- Se debe tener cuidado de prevenir contaminación cruzada de las muestras de ADN. Cambie las puntas entre las muestras de ADN cuando sea posible.
- Las actividades Pre- y Post-PCR deben estar estrictamente separadas físicamente. Use equipo, reactivos y batas de laboratorio especialmente designados.
- El bromuro de etidio es potencialmente carcinogénico. Debe usar siempre guantes protectores al preparar y manipular geles. Deseche los geles de bromuro de etidio y los tampones de acuerdo con las directrices locales y nacionales.
- Al ver y fotografiar geles de agarosa bajo luz ultravioleta, siempre evite la exposición directa y use protección facial con bloqueador UV adecuado, guantes desechables y batas de laboratorio.

Símbolos

Se han usado los siguientes símbolos no estándar:

Símbolo	Descripción
HLA-X MIX	Mezcla PCR locus específica
DNA POL-XXXX	ADN polimerasa
AEX1F	HLA-A exón 1 cebador de secuenciación hacia adelante. Refiérase a "Composición del Kit" y la Tabla 4 para otros cebadores de secuenciación.
	Fecha de fabricación (necesario para mercados fuera de la U.E.).

Procedimiento

1. PCR

1.1. Para cada locus que vaya a amplificar y para cada muestra individual a analizar, deberá realizar una reacción PCR separada. Cada ensayo deberá incluir controles positivos adecuados de genotipo conocido y al menos un control negativo para cada locus que se esté amplificando.

1.2. Prepare una solución fresca de mezcla maestra PCR cada vez que realice una PCR. Descongele rápidamente la mezcla PCR locus específica. Una vez descongelada agítela brevemente en el vortex.

1.3. Dispense la cantidad necesaria de mezcla PCR y ADN polimerasa en un tubo estéril para el número de muestras que serán examinadas (consulte la Tabla 1 a continuación para el volumen por reacción). Mezcle en el vortex brevemente 3 o 4 veces.

Locus	A	B	C	DRB1	DQB1	DPB1
Locus-específico PCR Mix p. ej. **HLA-A MIX**	16µL	16µL	16µL	16,7µL	16,7µL	16,7µL
ADN polimerasa p. ej. **DNA POL- HLA-A**	1µL	1µL	1µL	0,3µL	0,3µL	0,3µL

Tabla 1: Composición de la mezcla maestra necesaria para cada muestra.

1.4. Dispense 17µL de la mezcla maestra en cada pocillo en que ocurrirá la reacción.

1.5. Agregue 3µL de muestra de ADN o controles positivos adecuados a cada pocillo. Agregue 3µL de agua estéril al pocillo con el control negativo.

1.6. Selle los pocillos. Mezcle suavemente en el vortex y centrifugue brevemente

1.7. Coloque los pocillos en que ocurrirá la reacción en un Termociclador y hágalo funcionar de acuerdo con el siguiente plan.

95°C - 10 min

96°C - 20 s
60°C - 30 s
72°C - 3 min
} 33 ciclos

15°C - mantener

1.8. La amplificación demora aproximadamente 2,5 horas en completarse.

1.9. Una vez que la PCR se ha completado, saque la placa/los pocillos del Termociclador y proceda directamente a realizar la electroforesis en gel o almacene a 4°C hasta que se necesite.

NOTA: La purificación de amplicones con tratamiento con ExoSap debe realizarse dentro de las 24 horas de completada la PCR.

2. Electroforesis con gel de agarosa

2.1. Confirme la amplificación exitosa con electroforesis con gel de agarosa usando 2μL de cada producto PCR mezclado con 5μL de tampón de carga (volúmenes alternativos de tampón de carga deben se validados antes de usar). Se recomienda usar geles de agarosa al 1%.

2.2. El número y tamaños previstos de los amplicones resultantes variará de acuerdo al locus y el genotipo de la muestra. Los tamaños previstos de amplicones PCR están indicados en la Tabla 2.

Locus	Tamaños de bandas previstos	
HLA-A	≈ 2 kbp	
HLA-B	≈ 2 kbp	
HLA-C	≈ 1,1 kbp y 1,4 kbp	
HLA-DRB1	≈ 450 bp - 850 bp	(HH-PD5.2-5)
	≈ 630 bp - 980 bp	(LG-PD5.2-7)
	El patrón de las bandas variará dependiendo de la presencia de ciertos grupos de alelos específicos	
HLA-DQB1	≈ 300 bp y 500bp	(PQ-PD6.2-2)
	≈ 400 bp y 500 bp	(AN-PD6.2-3)
HLA-DPB1	≈ 400 bp	(HH-PD10.1)
	≈ 400 bp, ≈780 bp y ≈1470 bp	(KD-PD10.2-1)

Tabla 2: Tamaños de productos previstos en cada ensayo.

3. Purificación del producto PCR

NOTA: Se pueden utilizar sistemas de purificación que no sean ExoSAP-IT® o ExoProStar™ (p. ej. Agencourt® AMPure® XP o sistemas basados en columnas) para purificar estos productos PCR. Se recomienda insistentemente a los usuarios que validen estos procedimientos antes de proceder. Si utiliza el tratamiento EXOSAP se recomienda que el usuario siga el procedimiento descrito a continuación.

3.1. Prepare una mezcla maestra con 4μL de ExoSAP-IT® y o ExoProStar™ y 8μL of 2mM $MgCl_2$ para cada muestra a ser purificada. Suavemente pulse el vortex para agitar. Dispense 12μL de la mezcla maestra en los pocillos en que ocurrirá la reacción de cada muestra. Selle los pocillos, agite en el vortex y luego colóquelos en un agitador o en un vortex por 2 minutos. Centrifugue brevemente antes de colocarlos en el termociclador. proceda según el siguiente plan:

37°C – 30 min
80°C – 15 min
4°C - mantener

3.2. Una vez completado, diluya el producto purificado 1:4 con agua estéril. Este paso de dilución asegurará que haya suficiente plantilla para realizar las reacciones de secuenciación y asegurar que la concentración de la plantilla sea suficiente para producir datos de secuenciación de buena calidad.

NOTA: Puede ser necesario usar un factor de dilución más alto (p. ej. 1:8) si se observan consistentemente señales altas y ruido de fondo asociado y artefactos. Un producto PCR débil puede requerir un factor de dilución menor.

3.3. Las muestras tratadas con ExoSAP pueden conservarse a 4°C hasta que sea necesario usarlas. Estas muestras pueden almacenarse a 4°C hasta por una semana antes de su uso pero para almacenar a largo plazo, hacerlo a -20°C.

4. Reacción de secuenciación

NOTA: En situaciones en que hay que resolver ambigüedades heterocigotas con cebadores para secuenciación hemicigotos tales como HARPS®, refiérase a las instrucciones de uso del SBT Resolver™ HARPS®.

4.1. La tabla 3 enumera los cebadores de secuenciación que deben ser usados para cada locus.

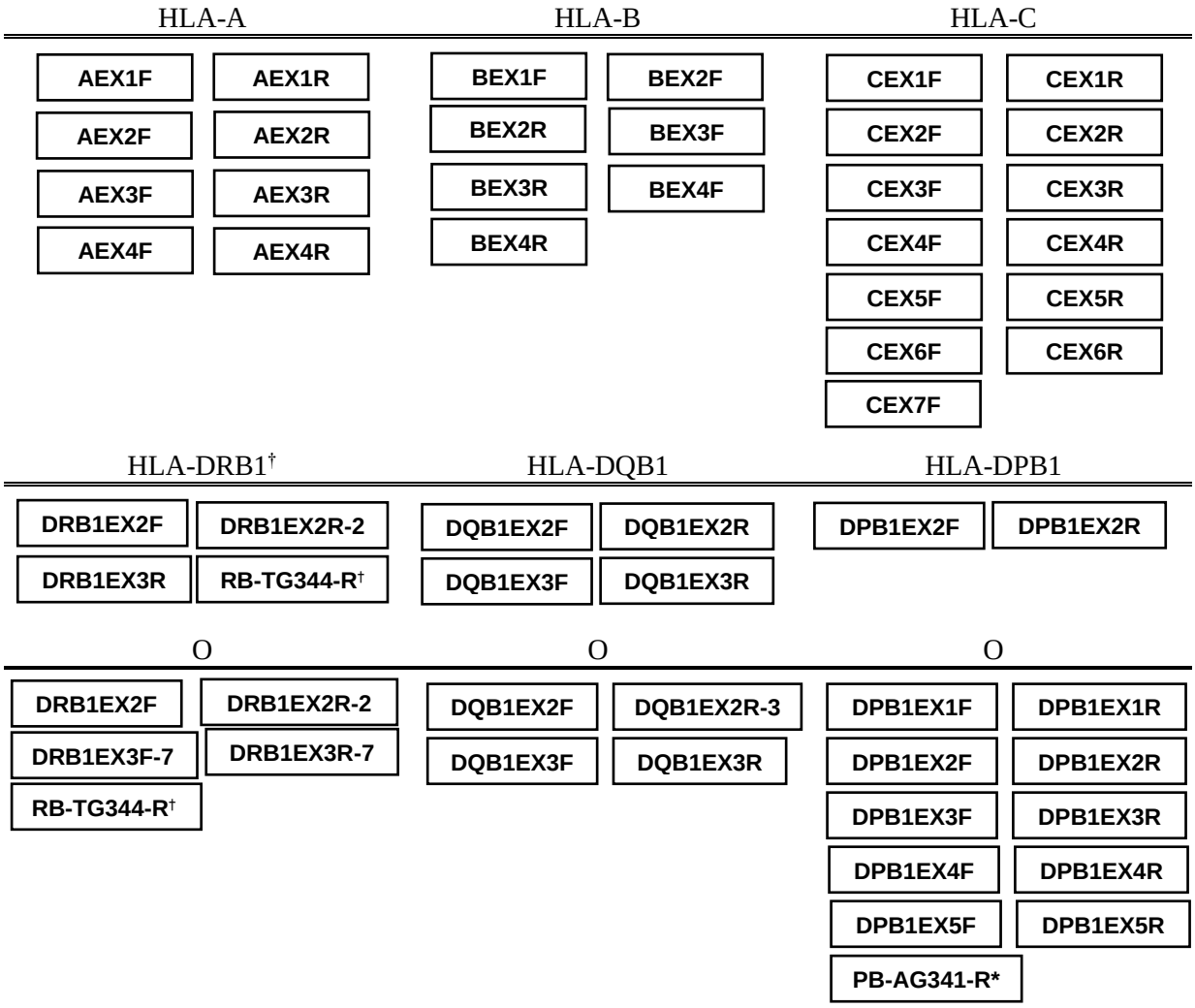

Tabla 3: Cebadores de secuenciación suministrados para usar con cada locus.

†RB-TG344-R es un HARP® dirigido al dimorfismo del codón 86. Su uso es opcional.
*****PB-AG341-R es un HARP® dirigido al dimorfismo del codón 85 en DPB1. Su uso también es opcional.

^DRB1EX3R-2 es un cebador de secuenciación DRB1 en los kits HH-PD5.2-5 que se comporta de manera similar a HARP y está diseñado para secuenciar los siguientes grupos alelos: *03, *08, *11, *12, *13, *14, *15 y *16. Este cebador producirá datos heterocigotos, homocigotos o ninguna secuenciación dependiendo del genotipo de la muestra tipificada. Al analizar datos DRB1EX3R-2 en Assign™ contra la referencia DRB1-FullX2, los datos resultantes del exón 3 serán analizados en un nivel separado y esto permitirá resolver una cantidad de ambigüedades de alelos del exón 3, como la ambigüedad DRB1*14:01 versus *14:54. Su uso es opcional dependiendo de la estrategia de tipificación utilizada por el laboratorio. Esto no es compatible con los kits LG-PD5.2-7 ya que la secuenciación bidireccional para el exón 3 está disponible.

4.2. Prepare una solución fresca de mezcla del cebador de secuenciación en hielo cada vez que lleve a cabo una reacción. La composición y volúmenes para la mezcla están indicadas **para cada muestra**.

Componente	**Volumen**
Cebador de secuenciación	2µL
Agua estéril	11,5µL
BigDye® Terminadores	1µL
5X Tampón de secuenciación	3,5µL

4.3. Mezcle cada reacción de secuenciación suavemente usando el agitador vortex.

4.4. Dispense 18µL de mezcla de reacción de secuenciación en cada uno de los tubos/pocillos respectivos.

NOTA: En ensayos con pocas muestras con muchos cebadores de secuenciación, es aceptable dispensar el cebador de secuenciación (2µL) directamente en los pocillos individuales en los que ocurrirá la reacción. Se puede crear a continuación una mezcla maestra con agua estéril, BigDye® Terminator y tampón Seq Rxn 5x, de la que se dispensarán 16uL en cada pocillo. Se recomienda encarecidamente que el usuario valide este procedimiento alternativo antes de su implementación.

4.5. Agregue 2µL de producto PCR purificado a cada pocillo correspondiente.

NOTA: Se debe tener cuidado para prevenir la contaminación cruzada de las reacciones de secuenciación.

4.6. Selle los pocillos, mezcle suavemente y centrifugue brevemente para asegurar que el contenido está localizado al fondo de cada pocillo.

4.7. Coloque los tubos en un termociclador y hágalo funcionar de acuerdo con el siguiente plan:

Número de ciclos	**Temperatura y tiempo**
25	96°C – 10 s 50°C – 5 s 60°C – 2 min
1	4°C – mantener

4.8. Una vez completado el programa, saque la placa/los pocillos del termociclador y proceda directamente a la purificación de los productos de reacción o almacene en la oscuridad a 4°C hasta que se necesiten. Se recomienda que las muestras sean purificadas y procesadas en el secuenciador de ADN dentro de 24 horas.

5. Purificación de los productos de la reacción de secuenciación

NOTA: La purificación de los productos de la reacción puede llevarse a cabo por procedimientos distintos al método de precipitación con etanol descrito aquí. Se recomienda insistentemente que el usuario valide estos procedimientos antes de proceder.

5.1. Centrifugue brevemente las placas/los pocillos antes de proceder. Si se han usado tapas reusables durante la fase de ciclos termales, etiquete las tapas para evitar contaminación cruzada.

5.2. Saque el sello cuidadosamente.

5.3. Agregue 5µL 125mM EDTA, pH8,0 a cada tubo de reacción. Asegúrese de que el EDTA alcance el fondo del tubo.

5.4. Agregue 60µL de etanol al 100% a cada pocillo de reacción. Selle la placa/los pocillos y agite en el vortex brevemente pero completamente para asegurar que quede totalmente mezclado.

5.5. Centrifugue los productos de extensión a 2000g por 45 min para formar un botón y **PROCEDA INMEDIATAMENTE AL SIGUIENTE PASO**. Si esto no es posible, vuelva a centrifugar por 10 min adicionales antes de proceder.

5.6. Saque los sellos de los pocillos y elimine el sobrenadante invirtiendo los pocillos sobre una toalla de papel absorbente.

5.7. Coloque los pocillos de reacción invertidos con la toalla de papel absorbente en la centrífuga. Centrifugue a 350g por 1 minuto para eliminar cualquier sobrenadante residual.

5.8. Saque los pocillos de la centrífuga y colóquelos con la abertura hacia arriba sobre la mesa de trabajo. Elimine la toalla de papel absorbente.

5.9. Prepare una solución fresca de etanol al 80% con etanol absoluto y agua estéril grado de cultivo celular.

5.10. Añada 60µL de 80% de etanol a cada pocillo. Vuelva a sellar los pocillos y agite brevemente en el vortex.

5.11. Centrifugue a 2000g por 5 min.

5.12. Repita los pasos 5.6 y 5.7.

5.13. Saque los tubos de reacción de la centrífuga y elimine las toallas de papel. Vuelva a sellar los pocillos y proceda al paso de desnaturalización. Si no, almacene en la oscuridad a -20°C. Se recomienda que los productos de extensión sean procesados en la secuenciación ADN dentro de las 24 horas de la preparación de las reacciones de secuenciación.

6. Desnaturalización & electroforesis de productos de la reacción de secuenciación

NOTA: Es posible que el procedimiento para la desnaturalización de los productos de extensión en Hi-Di™ Formamida descrito aquí, no sea necesario si se han utilizado otros procedimientos de purificación distintos a la precipitación con etanol.

Se recomienda encarecidamente que los procedimientos alternativos sean validados por el usuario antes de proceder.

6.1. Agregue 12µL de Hi-Di™ formamida a cada tubo de reacción. Agite con el Vortex y centrifugue la placa/los pocillos brevemente.

6.2. Incube los pocillos de reacción a 98°C por 5 minutos. Después de la incubación, asegure que los pocillos de reacción se enfríen rápidamente a temperatura ambiente (p. ej. colóquelos en hielo o utilice el termociclador para realizar los pasos de desnaturalización y enfriamiento) antes de colocarlos en el secuenciador. Si no es posible procesar las placas inmediatamente, almacene a 4°C hasta que se necesiten.

NOTA: Asegúrese que no hay burbujas en los pocillos de reacción. Estas pueden entrar y dañar el capilar.

6.3. Cargue los pocillos/la placa en el secuenciador automático y prepare el archivo de recolección de datos de acuerdo con las especificaciones del fabricante del secuenciador.

6.4. Los siguientes parámetros han sido validados para este instrumento por el fabricante usando el kit v3.1 de secuenciación Big Dye® Terminador y POP-7™. Es posible que estos parámetros deban ser validados por el usuario para otros polímeros, técnicas de secuenciación química e instrumentos. Refiérase al manual del usuario de cada instrumento para obtener instrucciones detalladas y ayuda (es decir, asegúrese de que el set de tintes es el adecuado para la química utilizada, por ejemplo, la química de secuenciación del terminador v1.1 Big Dye® requerirá un set de tintes diferentes).

Parámetro	**configuración**
Dye set	Z_BigDyeV3
Mobility file	KB_3730_POP7_BDTV3
Basecaller	KB.bcp
Run Module	Regular FastSeq50_POP7
Injection time	15 s
Run time	3000 s

6.5. Use el software de colección de datos del instrumento para procesar los datos en bruto y crear los archivos de secuenciación. Refiérase al manual del usuario del instrumento correspondiente para obtener instrucciones detalladas y ayuda.

7. Edición y análisis de los electroferogramas

Los kits del SBT Resolver™ fueron desarrollados y validados utilizando el software Assign™ SBT y Assign™ ATF desarrollado por Conexio Genomics Pty Ltd. Se recomienda a los usuarios utilizar Assign SBT versión 3.6+ y posteriores ya que estas versiones del software utilizan configuraciones y archivos de referencia diseñados específicamente para los kits de tipificación SBT Resolver™ y HARPS®. Para obtener más detalles sobre la operación de este software, consulte los manuales del usuario pertinentes que se pueden descargar del sitio web de Conexio Genomics (http://www.conexio-genomics.com).

Los datos de tipificación basados en la secuenciación generados utilizando los kits de tipificación SBT Resolver™ debe analizarse contra los siguientes archivos de referencia Assign™ que son suministrados por Conexio Genomics:

Ensayo	Código del producto	Archivo de referencia Assign
SBT Resolver™ HLA-A	XH-PD1.1-2	A.xml
SBT Resolver™ HLA-B	BS-PD2.1-2	B.xml
SBT Resolver™ HLA-C	HH-PD3.2-2	C.xml o Cw.xml
SBT Resolver™ HLA-DRB1	HH-PD5.2-5	DRB1-FullX2.xml
	LG-PD5.2-7	527_DRB1.xml
SBT Resolver™ HLA-DQB1	PQ-PD6.2-2	DQB1.xml
	AN-PD6.2-3	623_DQB1.xml
SBT Resolver™ HLA-DPB1	HH-PD10.1	DPB1.xml
	KD-PD10.2-1	DPB1.xml

Características del desempeño

Exactitud

Paneles de hasta 93 muestras del programa Internacional de Intercambio de ADN y Pruebas de Competencia de la UCLA (2008- 2010) usado para pruebas internas del kit SBT Resolver™ produjeron los siguientes resultados:

Locus	Número de muestras examinadas	Sensibilidad diagnóstica (% de PCR exitosos)	Especificidad diagnóstica (% de genotipos obtenidos)	Número de muestras discordantes	Número de muestras heterocigotas	Número de alelos únicos
HLA-A	81	100%	100%	0	74	20
HLA-B	82	100%	98,8%	0	79	81
HLA-C	39	97,5%	97,5%	0	35	21
HLA-DRB1	93	96,7%	96,7%	0	84	39
HLA-DQB1 (PQ-PD6.2-2)	42	100%	100%	0	36	14
HLA-DQB1 (AN-PD6.2-3)	38	100%	100%	0	34	15
HLA-DPB1 (HH-PD10.1)	77	100%	100%	0	60	18
HLA-DPB1 (KD-PD10.2-1)	16	100%	100%	2*	14	13

* Las dos muestras discordantes contenían información de secuenciación adicional fuera del exón 2 que no fue informada por el programa de prueba de competencia de “International DNA Exchange” de UCLA \una muestra contenía 131:01, pero fue informada como 13:01 por

el programa de prueba de competencia de "International DNA Exchange" de UCLA. Estos alelos discrepaban en el exón 1.

Para los kits SBT Resolver HLA-DRB1 (código del producto LG-PD5.2-7), se utilizó para análisis interno un panel de 23 muestras bien caracterizadas que cubrían un amplio rango de alelos. Asimismo, también se tipificó un panel de 293 muestras obtenidas de fuentes externas sin conocimiento previo sobre otros datos de tipificación HLA. Estas muestras también se analizaron con el ensayo SBT Resolver™ HLA-DQB1 (PQ-PD6.2-2). En los casos donde se obtuvo un resultado homocigoto las asociaciones DQB1/ DRB1para esas muestras se examinaron para confirmar el resultado así como para detectar situaciones donde se pudiera haber pasado por alto algún alelo

La prueba dio los siguientes resultados:

Locus	Número de muestras analizadas	Sensibilidad diagnóstica	Especificidad diagnóstica	Número de muestras discordantes	Número de muestras heterocigotas	Número de alelos únicos
HLA-DRB1	23	100%	100%	0	23	12
	286*	97,9%	99,6%	0	253	33

* Seis muestras no fueron amplificadas debido a muestras de ADN de mala calidad. Se encontró que una muestra contenía ADN contaminante, cuya fuente era el laboratorio de donde se obtuvieron las muestras. Como resultado de la contaminación, no fue posible obtener n genotipo para esa muestra.

El análisis de la secuencia de la PCR y de evaluación del rendimiento los sitios de secuenciación de cebadores y estudios de evaluación del desempeño, no han identificado ningún alelo común y bien documentado que no se amplifique por medio del uso recomendado de estos kits. Para mayor información, consulte el documento *SBT Resolver™ Primer Analysis* disponible en cada lanzamiento de referencia Assign™ SBT, que se pueden descargar del sitio web de Conexio Genomics (http://www.conexio-genomics.com).

Límite de detección

La concentración recomendada de ADN genómico humano de alto peso molecular es de es 20-100ng/µL. Pruebas internas han demostrado que muestras con concentraciones tan bajas como 5ng/µL también se pueden ser usadas. Asimismo se obtuvieron genotipos correctos de ADN de baja calidad o fragmentado.

Especificidad

Los kits de Conexio Genomics Pty Ltd's SBT Resolver™ son ensayos de locus específico. El uso de estos kits de acuerdo con estas instrucciones, deberían amplificar solo un locus. En la mayoría de los casos el uso de cebadores de secuenciación incorporados en cada kit producirá una tipificación HLA para la mayoría de las muestras sin necesidad de resolución adicional. En aquellas situaciones en que aún existan ambigüedades heterocigotas, se recomienda el uso de cebadores para resolver secuencias (tal como SBT Resolver™ HARPS®).

Se debe tener en cuenta que pueden ocurrir mutaciones en las amplificaciones o en los sitios de los cebadores de secuenciación y esto puede resultar en alélica de abandono. Las muestras que sugieren un resultado de tipificación homocigoto deben ser confirmadas con procedimientos alternativos.

Limitaciones y advertencias

- Se recomienda insistentemente que estos kits sean validados por el usuario antes de la implementación en el laboratorio usando muestras cuyo tipo HLA haya sido determinado por otros procedimientos basados en técnicas moleculares. Especialmente, cualquier desviación de este procedimiento (p. ej. la utilización de procedimientos de purificación de secuenciación de ADN o PCR alternativa) debe ser validado por el usuario antes de su implementación.
- Estos kits han sido validados utilizando paneles de muestras cuyos genotipos cubren una amplia gama de alelos. Sin embargo debe considerarse que es posible encontrar alelos raros y alelos con polimorfismos en la amplificación y secuenciación y es posible que estos no sean amplificados o secuenciados.
- La naturaleza de la tipificación HLA basada en la secuencia es tal, que otros factores aparte de la mezcla PCR pueden resultar en amplificación preferencial o alélica de abandono. Como consecuencia los resultados de tipificación que parecen ser homocigotos, deben ser confirmados utilizando métodos alternativos y/o genotipado de la familia.
- Un control positivo (ADN humano) y un control negativo (agua estéril) deben incluirse cada vez que se realiza la PCR. El control positivo debe producir un producto PCR del tamaño adecuado dependiendo de los locus amplificados y la secuencia resultante debe coincidir con el genotipo de la muestra. No deben haber productos PCR en la plantilla de control negativa en cada experimento. Si hay una banda evidente, puede que haya ocurrido contaminación en alguna etapa y el experimento debe ser repetido.
- Ocasionalmente pueden haber productos PCR evidentes más grandes y más tenues. Estas bandas adicionales no interfieren con los resultados de secuencia o la calidad.

Licencia

Los kits de SBT Resolver™ contienen GoTaq® Polimerasa de inicio en caliente (ADN POL) que es fabricada por Promega Corporation y es distribuida por Conexio Genomics Pty Ltd. Licenciada a Promega bajo patente de E.E.U.U. números 5.338.671 y 5.587.287 y sus patentes extranjeras correspondientes.

Referencias bibliográficas

1. Sayer D, Whidborne R, Brestovac B, Trimboli F, Witt C, Christiansen F (2001): *HLA-DRB1 DNA sequencing based typing: an approach suitable for high throughput typing including unrelated bone marrow registry donors.* Tissue Antigens **57:** 46-54.
2. Sayer D, Whidborne R, DeSantis D, Rozemuller EH, Christiansen F, Tilanus MG (2004). *A multicentre international evaluation of single-tube amplification protocols for sequencing-based typing of HLA-DRB1 and HLA-DRB3, 4, 5.* Tissue Antigens **63**: 412-423.
3. *Assign™ SBT v3.6+ Operator Manual,* Conexio Genomics Pty Ltd
4. *Assign™ SBT v4.7 Operator Manual,* Conexio Genomics Pty Ltd
5. *Assign™ SBT v471 Operator Manual,* Conexio Genomics Pty Ltd
6. Mayor información sobre el programa de intercambio de ADN de UCLA se encuentra en :http://www.hla.ucla.edu/cellDNA/DNA/programInfo.htm.

7. Los alelos HLA vigentes se encuentran en http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla.

Resolución de problemas

Problema	Causa(s) Posible(s)	Solución
Productos PCR ausentes o débiles	ADN de baja calidad	Evalúe la calidad del ADN con electroforesis en gel. El ADN intacto debería ser aproximadamente 3kb con poca o ninguna evidencia de manchas en el gel. Vuelva a extraer el ADN y repita la PCR cuando sea posible.
	Insuficiente cantidad de ADN agregado a la PCR	Compruebe que la concentración del ADN sea entre 20-100ng/µL. Vuelva a extraer el ADN y repita la PCR cuando sea posible.
	Presencia de inhibidores PCR en el ADN genómico	Evite el uso de muestras de sangre total con heparina. Vuelva a extraer el ADN y repita la PCR cuando sea posible.
	No se agregó ADN polimerasa a la mezcla maestra o la muestra maestra no se mezcló lo suficiente antes de agregarla a las muestras.	Repita la PCR. Asegúrese de que los componentes de la mezcla maestra se mezclen muy bien en el vortex.
	Problemas con termociclación	Compruebe los parámetros de ejecución de los ciclos termales. Compruebe la historia de los procedimientos para asegurarse que el procedimiento no fue terminado en forma prematura. Asegúrese que el termociclador está funcionando de acuerdo con las especificaciones del fabricante y es sometido a mantenimiento regularmente.
	No se agregó bromuro de etidio al gel	Sumerja el gel en un baño de tintura que contenga 1X TBE con 0,5mg/mL de bromuro de etidio. Decolore en 1X TBE antes de registrar la imagen del gel. Asegúrese de agregar el bromuro de etidio al gel antes de verter.

	Las muestras de ADN se eluyen o diluyen en agua que puede tener un pH ligeramente acídico	Siempre que sea posible utilice agua estéril con un pH neutro
Productos PCR débiles o ausentes para la banda del exón 3-5 para el ensayo KD-PD10.2-1	ADN de mala calidad	La amplificación de muestras de muy mala calidad puede resultar en la amplificación débil del amplicon del exón 3-5. Aún así, se puede obtener tipificación utilizando los datos de secuenciación del exón 1 y 2. De lo contrario vuelva a extraer el ADN y repita la PCR di es posible
Tamaño de las bandas son incorrectos	El kit usado es incorrecto	Compruebe que está usando el kit que corresponde.
	Programa de termociclador usado es incorrecto	Compruebe los parámetros del termociclador.
	Contaminación de la PCR	Compruebe el control negativo por si hay evidencia de contaminación. Descontamine la superficie de trabajo y repita la PCR. Repita la PCR para identificar la fuente de la contaminación. Considere usar un kit nuevo. Si el ADN genómico de una muestra parece estar contaminado, vuelva a extraerlo u obtenga una fuente alternativa de ADN.
Intensidad de la señal de los electroferogramas es débil	Producto PCR débil	Compruebe la imagen del gel. NO se recomienda secuenciar bandas de PCR débiles ya que la calidad de la secuencia puede ser insuficiente para SBT. Considere usar un factor de dilución menor (p. ej.1:2, 1:3) después de la purificación PCR.
	Cantidad insuficiente de productos de reacción aplicados al secuenciador	Compruebe los parámetros del secuenciador. Puede ser necesario aumentar el tiempo de inyección y el voltaje.
	Problemas durante la purificación de los productos del secuenciador	Sea extremadamente cuidadoso al desechar el sobrenadante ya que se puede soltar el botón.
Intensidad de la señal demasiado alta. (Presencia de picos fluorescentes altos-artefactos)	Demasiado producto PCR	Compruebe la imagen del gel. Considere usar un factor de dilución más alto después de la purificación PCR. Compruebe la cantidad de

		ADN polimerasa usada en la PCR.
	Demasiados productos de reacción aplicados al secuenciador.	Compruebe los parámetros del instrumento. Considere reducir el tiempo de inyección y voltaje.
Línea basal ruidosa (alto ruido de fondo)	Producto PCR contaminado	Refiérase a acciones correctivas enumeradas anteriormente.
	Amplificación de genes HLA estrechamente relacionados	Compruebe los parámetros de los ciclos térmicos.
	Purificación de PCR deficiente	Asegúrese que el tratamiento con ExoSAP se lleve a cabo de acuerdo con las instrucciones de uso para el usuario del kit. Asegúrese que la mezcla PCR se mezcle totalmente con ExoSAP. Considere utilizar ExoSAP siguiendo las instrucciones del fabricante (aumentando la cantidad de enzima) o considere una técnica de purificación alternativa.
	Reacciones de secuenciación contaminadas	Asegúrese de tomar todos los pasos para prevenir contaminación cruzada. Cambie las puntas de las pipetas siempre que sea posible. Agregue los líquidos desde arriba en los pocillos de la reacción. Evite aerosoles.
	Cebador de secuenciación contaminado	Compruebe la calidad de la secuencia de los otros cebadores de secuenciación y de otras muestras utilizando el mismo cebador. Considere utilizar una alícuota fresca del cebador de secuenciación.
	Mezcla de tinte terminador o tampón secuenciador contaminado	Repita la secuenciación con una alícuota de reactivos fresca.
	Purificación deficiente de productos de secuenciación	Repita la secuenciación y asegúrese que la purificación se realice de acuerdo con las instrucciones de fabricante
Presencia de manchas por el tinte	Purificación deficiente de productos de secuenciación	Purifique los productos de acuerdo con las instrucciones del kit. Asegúrese que el lavado de los productos con etanol al 80% sea suficiente.

Productos relacionados

IVD con marca CE:

ASSIGN™ SBT 3.8+ Código del producto: CGX0036+

ASSIGN™ SBT v4.7 Código del producto: CGX00470

ASSIGN™ SBT v471 Código del producto: CGX00471

SBT RESOLVER™ HARPS

Códigos de los productos:

C1-TT98-F(20)	C1-AC98-F(20)	C1-TC98-F(20)	C1-TA98-F(20)	C1-CA102-F(20)
C1-CT102-F(20)	C1-CC102-F(20)	C1-AG203-F(20)	C1-GT240-F(20)	C1-TT368-F(20)
C1-GG307-R(20)	C1-GG363-AF(20)	C1-TA363-F(20)	C1-AT362-F(20)	C1-AC497-F(20)
C1-TA368-F(20)	C1-GT355-R(20)	C1-GG362-R(20)	C1-CT423-F(20)	C1-CG570-R(20)
C1-BTA-F(20)	C1-BCG-F(20)	C1-CC144-F(20)	C1-AC206-F(20)	C1-GC209-F(20)
C1-GA206-F(20)	C1-CG319-F(20)	C1-CA309-R(20)	C1-GAT309-R(20)	C1-GAA309-R(20)
C1-AG360-F(20)	C1-GC363-F(20)	C1-GG363-BF(20)	C1-TA420-F(20)	C1-AC362-F(20)
C1-CC486-F(20)	C1-CT559-R(20)	C1-GA559-R(20)	C1-AC559-R(20)	C1-GG572-R(20)
C1-CG572-R(20)	C1-GAG601-R(20)			
C1-CT97-F(20)	C1-CT112-F(20)	C1-CG134-F(20)	C1-AG270-F(20)	C1-AC302-R(20)
C1-GC302-R(20)	C1-CG343-F(20)	C1-CA343-F(20)	C1-GA361-F(20)	C1-TG539-R(20)
C1-GG539-R(20)	C1-AA601-R(20)	C1-AG595-R(20)		
RB-01-F(20)	RB-04-F(20)	RB-09-F(20)	RB-15-F(20)	RB-52-F(20)
RB-GG125-F(20)	RB-AA197-F(20)	RB-TT197-F(20)	RB-GT196-F(20)	RB-GA196-F(20)
RB-TA164-F(20)	RB-TT227-F(20)	RB-AT258-F(20)	RB-GC258-F(20)	RB-CT257-R(20)
RB-AT257-R(20)	RB-TT321-R(20)	RB-GT344-R(20)	RB-TG344-R(20)	
QB-TA122-F(20)				
QB-TA173-F(20)	QB-CT173-F(20)	QB-TA185-F(20)	QB-CG353-R(20)	QB-GG353-R(20)
PB-AT251-R(20)	PB-GT313-R(20)	PB-TAC121-F(20)	PB-GG341-R(20)	PB-GC194-F(20)
PB-AG341-R(20)	PB-GC112-F(20)			

Solo para uso en investigación:

SBT RESOLVER™

AN-PD11.0-0(20) AN-PD11.0-0(50)	SBT Resolver™ HLA-DRB3 kit (20 y 50 pruebas)
AN-PD12.0-0(20) AN-PD12.0-0(50)	SBT Resolver™ HLA-DRB4 kit (20 y 50 pruebas)
AN-PD13.0-0(20) AN-PD13.0-0(50)	SBT Resolver™ HLA-DRB5 kit (20 y 50 pruebas)
LC-PD2.9(20) LC-PD2.9(50)	SBT Resolver™ HLA-B57 kit (20 y 50 pruebas)

Nota: los productos listados arriba están licenciados como IVD en Australia

Reactivos de laboratorio para uso general

MgCl2 – 1.0(50) MgCl2 - 1.0(3000))	2mM $MgCl_2$
SEQ BUF – 2.0(400) SEQ BUF – 2.0(5000)	5x Seq Rxn Buffer
EDTA – 3.0(200) EDTA – 3.0(5000)	125mM EDTA, pH8.0

Para mayor información póngase en contacto con su distribuidor local.

CE 0197 CE

Para obtener detalles sobre cómo hacer un pedido referirse al sitio web de Olerup (http://www.olerup.com).

Kits auto certificados:

HH-PD3.2-2(20) HH-PD3.2-2(50)	SBT Resolver™ HLA-C kit (20 y 50 pruebas)
PQ-PD6.2-2(20) PQ-PD6.2-2(50) AN-PD6.2-3(20) AN-PD6.2-3(50)	SBT Resolver™ HLA-DQB1 kit (20 y 50 pruebas)
HH-PD10.1(20) HH-PD10.1(50) KD-PD10.2-1(20) KD-PD10.2-1(50)	SBT Resolver™ HLA-DPB1 kit (20 y 50 pruebas)

Soporte y dónde contactarnos

Conexio Genomics Pty Ltd
PO Box 1294
Fremantle 6959
Western Australia
Australia
Teléfono: +61-08-9336-4212
Correo electrónico: support@conexio-genomics.com
Skype: conexiocgx
Sitio web: www.conexio-genomics.com

O su distribuidor local

Conexio y HARPS son marcas registradas de Conexio 4 Pty Ltd. HARPS® es una marca registrada en algunos territorios.